

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 :  
C12N 15/86, 15/34, 15/70, 7/01, 1/21,  
A61K 35/76 // (C12N 1/21, C12R 1:19)  
A1  
(11) Numéro de publication internationale: WO 96/25506  
(43) Date de publication internationale: 22 août 1996 (22.08.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00215  
(22) Date de dépôt international: 9 février 1996 (09.02.96)  
(30) Données relatives à la priorité:  
95/01632 13 février 1995 (13.02.95) FR  
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).  
(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel-Voisin, F-92330 Sceaux (FR). NAUDIN, Laurent [FR/FR]; 1057, rue de Saint-Fiacre, F-45370 Cléry-Saint-André (FR). ORSINI, Cécile [FR/FR]; 19, rue de la Voute, F-75012 Paris (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR).  
(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).

(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.  
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING A RECOMBINANT ADENOVIRUS GENOME

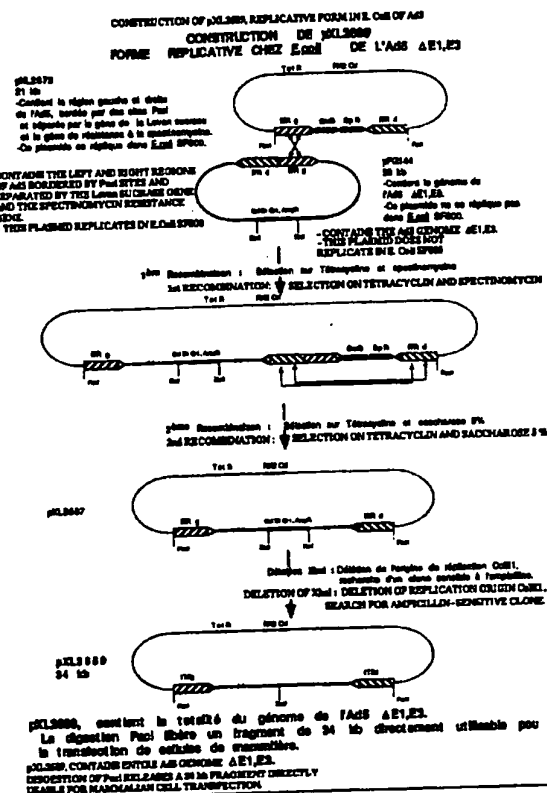
(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION DE GENOME D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

(57) Abstract

A novel method for preparing recombinant adenoviruses and the use of such adenoviruses in gene therapy are disclosed. Plasmids used in the construction of said adenoviruses are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'adénovirus recombinants et l'utilisation desdits adénovirus en thérapie génique. Elle concerne également des plasmides utilisés pour la construction de ces adénovirus.



# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

PROCEDE DE PREPARATION DE GENOME D'ADENOVIRUS  
RECOMBINANTS

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'adénovirus recombinants et l'utilisation de ces adénovirus en thérapie génique. Elle  
5 concerne également des plasmides procaryotes adaptés à la préparation de ces adénovirus.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc.) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit  
10 in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989)  
15 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations  
20 cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc.), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Parmi ces virus, les adénovirus présentent certaines propriétés intéressantes pour une utilisation en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de  
25 la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme. Les adénovirus ont ainsi été utilisés pour transférer des gènes d'intérêt dans le muscle (Ragot et al., Nature 361 (1993) 647), le foie (Jaffe et al., Nature genetics 1 (1992) 372), le système nerveux (Akli et al., Nature genetics 3 (1993) 224), etc.

30 Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes

tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur  
5 base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes d'adénovirus (Ad2, Ad7, Ad12, etc.) ont également été séquencées.

Compte tenu des propriétés des adénovirus mentionnées ci-dessus, et compte tenu du fait qu'il est possible d'obtenir des titres viraux élevés, ceux-ci ont déjà été  
10 utilisés pour le transfert de gènes *in vivo*. A cet effet, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes ( $\beta$ -gal, OTC, a-1AT, cytokines, etc.). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de répliquer après transfert génique. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés des régions E1 et  
15 éventuellement E3 au niveau desquelles sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). D'autres constructions comportent une délétion au niveau de la région E1 et d'une partie non essentielle de la région E4 (WO94/12649), ou une organisation génomique modifiée (FR 94 13355).

20 Cependant, l'exploitation industrielle et thérapeutique des adénovirus est encore limitée par les méthodes actuelles de préparation de ces virus recombinants.

Les adénovirus sont en effet produits par transfection de l'ADN du virus recombinant dans une lignée cellulaire d'encapsidation compétente. Il peut s'agir d'une transfection simple, lorsque l'on peut disposer d'une construction portant l'ensemble du  
25 génome du virus recombinant, ou, comme c'est le cas le plus souvent, d'une co-transfection de plusieurs fragments d'ADN apportant les différentes parties du génome viral recombinant. Dans ce cas, le procédé implique une ou plusieurs étapes de recombinaison homologue entre les différentes constructions dans la lignée cellulaire d'encapsidation, pour générer l'ADN du virus recombinant. Pour la mise en oeuvre de  
30 l'une ou l'autre de ces méthodes, il est donc nécessaire de disposer des constructions appropriées, portant l'ensemble ou des parties du génome de l'adénovirus recombinant que l'on souhaite produire.

Il existe différentes méthodes décrites dans l'art antérieur pour la préparation de ces constructions in vitro. La technique la plus généralement utilisée consiste à isoler l'ADN viral puis à le modifier in vitro par les méthodes classiques de biologie moléculaire (digestion, ligature, etc.). Les constructions obtenues sont ensuite purifiées et utilisées pour transfecter les lignées d'encapsidation. Toutefois, cette technique implique la production de stocks de virus et la purification d'ADN viral pour chaque construction ou pour toute manipulation de l'ADN du virus recombinant. Une autre technique repose sur l'utilisation d'un plasmide portant une partie du génome du virus recombinant, qui est co-transfecté avec un virus apportant la partie manquante du génome. Néanmoins, comme indiqué ci-avant, cette méthode implique une recombinaison dans la lignée d'encapsidation et la disposition d'un virus supplémentaire approprié. Pour remédier à ces inconvénients, il a été proposé d'utiliser des plasmides procaryotes pour préparer les ADN viraux utilisables pour la transfection. En particulier, Bett et al. (PNAS 91 (1994) 8802) décrit la construction d'un plasmide réplcatif chez *E. coli* comportant un génome adénoviral modifié (plasmide pBHG10). Plus précisément, ce plasmide porte un génome adénoviral délété des régions E1, E3 et Psi, circularisé par jonction des séquences ITR, et qui comprend, insérée au niveau de la région 188-1339 du génome de l'adénovirus, une partie du plasmide pBR322. Ce plasmide peut être répliqué chez *E. Coli*, manipulé pour l'insertion de gènes d'intérêt, mais il présente toujours des inconvénients. Son utilisation pour la production de virus implique notamment l'emploi d'un second plasmide au moins apportant la région gauche du génome viral. D'autres plasmides de ce type et présentant le même genre d'inconvénients ont été décrits par exemple par Graham (EMBOJ. 3(12) (1984) 2917). Ces plasmides nécessitent aussi de procéder à une étape de recombinaison dans les cellules d'encapsidation.

En particulier ces technologies nécessitent l'utilisation de différents plasmides pour permettre la manipulation dans différentes régions du génome adénoviral. De plus l'obtention du virus recombinant n'a lieu qu'après recombinaison homologue des fragments génomiques co-transfectés dans les cellules d'encapsidation. Ceci limite d'autant la fréquence d'obtention des virus recombinants et le processus global est lent.

Il existe donc dans l'art antérieur un besoin clair de pouvoir disposer de plasmides appropriés, facilement manipulables et amplifiables in vitro, pour la préparation de génomes adénoviraux recombinants. Il est également important que les génomes ainsi produits soient pratiquement dépourvus de régions provenant du

plasmide, qui sont susceptibles (i) d'induire une réponse immunitaire (ii) de coder pour des protéines de résistance et (iii) de réduire la capacité du virus en tant que vecteur.

5 La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente invention décrit en effet des plasmides répondant à toutes ces exigences et permettant ainsi une production clonale rapide et efficace d'adénovirus recombinants utilisables thérapeutiquement.

Plus particulièrement, un premier objet de l'invention réside dans un plasmide procaryote comprenant un génome d'adénovirus recombinant bordé par un ou plusieurs sites de restriction non présent dans ledit génome.

10 Un tel plasmide est représenté par exemple sur la figure 2.

Le génome d'adénovirus recombinant présent dans les plasmides selon l'invention est avantageusement un génome complet. Ceci est particulièrement intéressant puisque cela permet de s'affranchir de l'emploi d'une deuxième construction apportant une autre partie du génome viral, et de l'étape de recombinaison dans la  
15 lignée d'encapsidation. Un autre avantage des plasmides selon l'invention provient du fait que le génome adénoviral n'est pas interrompu par des régions du plasmide procaryote. De ce fait, les génomes produits ne contiennent pas de régions du plasmide dont les inconvénients ont été mentionnés ci-avant. Par ailleurs, dans les plasmides selon l'invention, les ITR du génome adénoviral ne sont pas jointes, ce qui  
20 permet d'obtenir des ADN viraux linéaires, directement utilisables pour produire les virus recombinants.

De manière plus préférentielle, les plasmides selon l'invention comprennent donc une première région permettant la répllication dans les cellules procaryotes et une deuxième région comportant le génome adénoviral bordé d'un ou plusieurs sites de  
25 restriction non présent dans ledit génome.

Plus préférentiellement, les plasmides selon l'invention comprennent également une région permettant la sélection des cellules procaryotes contenant ledit plasmide. Cette région peut être constituée notamment par tout gène conférant la résistance à un produit, et notamment à un antibiotique. Ainsi, on peut citer les gènes conférant une  
30 résistance à la kanamycine (Kan<sup>r</sup>), à l'ampicilline (Amp<sup>r</sup>), à la tétracycline (tet<sup>r</sup>) ou à la spectinomycine, par exemple, qui sont couramment utilisés en biologie moléculaire (Maniatis et al., 1989). La sélection de plasmides peut se faire par d'autres gènes que

des gènes codant pour des marqueurs de résistance à un antibiotique. D'une manière générale, il s'agit d'un gène qui donne à la bactérie une fonction qu'elle ne possède plus (cela peut correspondre à un gène qui a été délété sur le chromosome ou rendu inactif), le gène sur le plasmide rétablissant cette fonction. A titre d'exemple il peut s'agir d'un gène d'un ARN de transfert qui rétablit une fonction chromosomique déficiente (Somoës *et al.*, 1991).

La région permettant la réplication dans les cellules procaryotes utilisée dans les plasmides de l'invention peut être toute origine de réplication fonctionnelle dans les cellules choisies. Il peut s'agir d'une origine de réplication issue d'un plasmide du groupe d'incompatibilité P (exemple = pRK290) qui permet la réplication dans les souches d'*E. Coli* pol A. Plus généralement, il peut s'agir de toute origine de réplication issue d'un plasmide se répliquant dans les cellules procaryotes. Ce plasmide peut être un dérivé de pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977), un dérivé de pUC (Viera et Messing, 1982), ou d'autres plasmides dérivant du même groupe d'incompatibilité, c'est à dire de ColE1 ou de pMB1 par exemple. Ces plasmides peuvent être choisis par ailleurs dans d'autres groupes d'incompatibilité se répliquant chez *Escherichia coli*. Il peut s'agir de plasmides dérivés de plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité A, B, FI, FII, FIII, FIV, H1, H11, I1, I2, J, K, L, N, OF, P, Q, T, U, W, X, Y, Z ou 9 par exemple. D'autres plasmides peuvent encore être utilisés, parmi lesquels des plasmides ne se répliquant pas chez *E. coli* mais chez d'autres hôtes tels que *B. subtilis*, *Streptomyces*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Enterococcus faecium* ou *Clostridium*. A titre préférentiel, on utilise les origines de réplication issues de plasmides se répliquant chez *E. coli*.

Comme indiqué précédemment, le génome adénoviral présent dans les plasmides de l'invention est avantageusement un génome complet ou fonctionnel, c'est-à-dire ne nécessitant pas l'apport d'autres régions par recombinaison ou ligature pour la production des stocks viraux dans les lignées d'encapsidation choisies.

Préférentiellement, le génome adénoviral recombinant comprend au moins des séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation.

Les séquences inversées répétées (ITR) constituent l'origine de réplication des adénovirus. Elles sont localisées aux extrémités du génome viral (Cf figure 1), d'où elles peuvent être isolées aisément selon les techniques classiques de biologie

moléculaire connues de l'homme du métier. La séquence nucléotidique des séquences ITR des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence ITR gauche correspond à la région comprenant les nucléotides 1 à 103 du génome.

La séquence d'encapsidation (également désignée séquence Psi) est nécessaire à l'encapsidation du génome viral. Elle est localisée dans le génome des adénovirus sauvages, entre l'ITR gauche et la région E1 (Cf figure 1). Elle peut être isolée ou synthétisée artificiellement par les techniques classiques de biologie moléculaire. La séquence nucléotidique de la séquence d'encapsidation des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, une séquence d'encapsidation fonctionnelle est comprise entre les nucléotides 194 et 358 du génome.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le génome de l'adénovirus utilisé est dépourvu de tout ou partie de la région E1. La région E1 est en effet essentielle à la réplication virale et son inactivation conduit à la formation de virus défectifs pour la réplication, c'est-à-dire incapables de se répliquer de façon autonome après transfert génique in vivo. La région E1, ou tout autre région virale considérée, peut être rendue non fonctionnelle par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être facilement réalisées directement sur les plasmides de l'invention, par exemple, au moyen des techniques du génie génétique. Avantagusement, le génome de l'adénovirus utilisé est dépourvu d'une partie de la région E1 comprise entre les nucléotides 454 à 3328 (fragment PvuII-BglIII) ou 382 à 3446 (fragment HinfII-Sau3A).

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le génome de l'adénovirus utilisé est également dépourvu de tout ou partie de la région E3 et/ou E4 et/ou IVA2. La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des virus portant ces différents types de délétions. Ces délétions supplémentaires permettent d'accroître la sécurité du vecteur et d'augmenter sa capacité.

Préférentiellement, le génome adénoviral est dépourvu d'une partie de la région E4 comprenant au moins les phases ORF3 et ORF6. Le génome adénoviral peut



également être modifié comme décrit dans la demande FR9413355 incorporée à la présente par référence, de manière à éviter les risques de contamination par des particules de réplication.

- 5      Préférentiellement, le génome adénoviral recombinant contient en outre une acide nucléique d'intérêt. L'acide nucléique d'intérêt peut être inséré en différents sites du génome de l'adénovirus. Avantageusement, il est inséré au niveau de la région E1, E3 ou E4. Cependant, il est clair que d'autres sites peuvent être utilisés. En particulier, l'accès à la séquence nucléotidique du génome permet à l'homme du métier d'identifier des régions permettant d'insérer l'acide nucléique
- 10     d'intérêt.

L'acide nucléique d'intérêt peut être toute séquence d'ADN introduite dont le transfert et/ou l'expression dans la cellule cible est recherchée.

En particulier, il peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques et/ou un ou plusieurs gènes codant pour des peptides antigéniques.

- 15      Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tout gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

- Il peut s'agir d'un produit homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit peut
- 20      également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule lui permettant de lutter contre une pathologie.

- Parmi les produits thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (WO93/19191), les facteurs de croissance, les
- 30      neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (WO94/25073), la dystrophine ou une

minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (WO9424297), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes suicide (TK, etc), etc.

5 Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308.

10 Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique d'intérêt peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation de vaccins permettant d'immuniser l'homme, notamment contre des microorganismes ou des virus. Il peut s'agir  
15 notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, l'acide nucléique d'intérêt comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide  
20 antigénique dans la cellule infectée. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux.  
25 Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation,  
30 de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque le gène inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus déficient en aval d'une telle séquence. Enfin, l'acide nucléique d'intérêt peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut

être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Les plasmides selon l'invention peuvent être construits en utilisant des adénovirus d'origine diverse. Différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont en effet été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO 94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple].

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'adénovirus utilisé est un adénovirus d'origine humaine. Selon un autre mode avantageux, l'adénovirus est un adénovirus d'origine animale.

Comme indiqué ci-avant, le génome d'adénovirus recombinant est avantageusement bordé d'un ou plusieurs sites de restriction absents dudit génome. Ce ou ces sites permettent d'exciser de manière simple et efficace le génome adénoviral recombinant du plasmide. La séquence génomique de l'adénovirus étant connue et accessible, l'homme du métier peut sélectionner par des expériences de routine des sites de restriction absent de ce génome. A titre d'exemple, on peut citer les sites PacI, NspV et SwaI (pour Ad5) ou SnaBI (dans Ad2). Il est également possible de rendre certains sites uniques en modifiant la séquence du génome adénoviral. Ainsi, d'autres enzymes peuvent être utilisées si les sites de restriction correspondants sont supprimés, modifiés ou délétés dans la séquence adénovirale construite chez E. coli. Les sites peuvent être positionnés directement à côté des extrémités du génome adénoviral, ou espacés de quelques paires de bases.

Un plasmide particulièrement préféré au sens de l'invention est le plasmide pXL2638 comprenant l'origine de répllication du plasmide RK2, le gène de résistance à la tétracycline, et un génome d'adénovirus recombinant possédant des régions E1 et E3 non fonctionnelles et bordé de 2 sites Pac I. Un acide nucléique d'intérêt peut être inséré en différents sites du génome adénoviral, et notamment au niveau des régions

E1, E3 et E4. Différents sites de restriction peuvent être utilisés à cet effet, tel que notamment le site XbaI.

Les plasmides selon la présente invention peuvent être construits de différentes manières. Selon une méthode préférée, on construit dans un premier temps des fragments portant les ITR du génome adénoviral, bordés du ou des sites de restriction appropriés. Ces ITR sont ensuite introduites dans un plasmide procaryote, puis, dans une troisième étape, le génome adénoviral recombinant est reconstruit entre les ITR, soit par ligature, soit par recombinaison. De manière préférée, le génome est reconstruit par recombinaison entre le génome adénoviral recombinant désiré et les régions homologues (comprenant les ITR et les régions flanquantes) du plasmide.

Plus particulièrement, la reconstruction du génome peut être réalisée chez *E. coli* en utilisant une souche *polA* afin de sélectionner les événements de recombinaison homologue. Il est évident que ces constructions peuvent aussi être réalisées en l'absence de systèmes permettant de sélectionner des événements de recombinaison. En effet de tels événements de recombinaison peuvent être criblés par minipréparation, perte ou acquisition d'un marqueur, ou bien criblage à l'aide de sondes radioactives spécifiques pour les jonctions obtenues ou perdues. De plus, il existe d'autres techniques permettant de sélectionner des événements de recombinaison homologue chez *E. coli*. Parmi celles-ci, citons l'utilisation de plasmides thermosensibles pour leur répllication (Hamilton *et al.*, 1989), l'utilisation de molécules circulaires non répliquatives (décrite par exemple par Slater et Maurer, 1993), l'utilisation de souches dans lesquelles le vecteur utilisé ne se réplique pas (Miller et Mekalanos, 1988, Zeef *et al.*, 1994), etc. Tous ces systèmes peuvent être utilisés à la place de souches *polA* et d'une transformation avec un plasmide dérivé de pBR322, ou ses nombreux dérivés, ou d'autres plasmides à répllication PolA-dépendante ou bien des plasmides ne se répliquant pas chez *Escherichia coli*.

Un autre objet de la présente demande concerne toute cellule procaryote contenant un plasmide tel que défini ci-avant. Il peut s'agir en particulier de toute bactérie pour laquelle il existe un système de vecteur où l'ADN recombinant peut être introduit. Citons par exemple *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium meliloti* ou les bactéries du genre *Streptomyces*. Ces cellules sont obtenues avantageusement par transformation selon les techniques connues de l'homme du métier. La transformation peut notamment être effectuée par la technique de transformation au CaCl<sub>2</sub> (Dagert et Ehrlich, 1979), ou celle mise au point par Hanahan

et al. (1983) ou toute technique dérivée de celle-ci (Maniatis et al., 1989), ainsi que par électrotransformation (Wirth et al., 1989). Voir également les techniques générales de Biologie Moléculaire ci-après.

5 Un autre objet de la présente invention réside dans un procédé de production de génomes d'adénovirus recombinants. Selon ce procédé, des cellules procaryotes telles que décrites ci-dessus sont cultivées puis, dans une deuxième étape, les plasmides sont récupérés. Avantagusement, la culture est réalisée pendant un temps suffisamment long pour produire des quantités appropriées de plasmide. Le plasmide peut être récupéré par toute technique connue de l'homme du métier pour la  
10 préparation d'ADN plasmidique. Ainsi, il peut être récupéré par préparation d'un lysat clair suivi d'une centrifugation dans un gradient en chlorure de césium (Maniatis et al., 1989). D'autres techniques peuvent être utilisées, faisant appel à d'autres méthodes de lyse utilisant le triton X-100, par exemple (Ausubel et al., 1987), ou bien une colonne d'échange d'anions après l'étape de lyse et de séparation de l'ADN plasmidique vis à vis  
15 de la majorité de l'ADN chromosomique et des protéines. Les plasmides ainsi récupérés peuvent ensuite être purifiés et traités en présence de l'enzyme de restriction correspondant aux sites bordant le génome viral. Ceci permet en une seule étape de générer un génome d'adénovirus recombinant linéaire, directement utilisable pour la production clonale de virus recombinants.

20 A cet égard, une première méthode pour préparer les virus recombinants consiste à transfecter le génome viral produit à partir des plasmides de l'invention dans une lignée cellulaire d'encapsidation compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la complémentation du virus déficient. Ces fonctions sont préférentiellement intégrées dans le génome de la cellule, ce qui réduit les risques de  
25 recombinaison, et confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire.

Une seconde approche consiste à co-transfecter dans une lignée cellulaire appropriée le génome recombinant préparé et l'ADN d'un ou de plusieurs virus ou plasmide helper. Selon cette méthode, il n'est pas nécessaire de disposer d'une lignée cellulaire compétente capable de compléter toutes les fonctions défectives de  
30 l'adénovirus recombinant. Une partie de ces fonctions est en effet complémentée par le ou les virus helper. Ce ou ces virus helper sont eux-mêmes défectifs.

Parmi les lignées cellulaires utilisables, on peut citer notamment la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de

l'adénovirus humain Ad5 (12 %). La transfection peut être réalisée avantageusement directement avec le produit de digestion du plasmide obtenu selon le procédé décrit ci-avant, sans étape de purification du génome adénoviral.

5 La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants préparé selon ce procédé. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

10 Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de  
15 solutés injectables.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont  
20 formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale  
25 sont bien documentées dans la littérature.

Selon la séquence d'ADN hétérologue insérée, les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose kystique, etc), les maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), les cancers, les pathologies liées  
30 aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### LEGENDE DES FIGURES

**Figure 1 :** Organisation génétique de l'adénovirus Ad5

5 **Figure 2 :** Cartes de restriction de pXL2626 et pXL2627.

Amp<sup>r</sup> : gène de résistance à l'ampicilline; pMB1 Ori, origine de réplication de pMB1; Tet<sup>r</sup>, gène de résistance à la tétracycline; RK2 Ori, origine de réplication du plasmide RK2. Les parties circulaires des cartes des plasmides ne sont pas à la même échelle que celle de 0.8 kb indiquée pour les 2 ITR.

10 **Figure 3 :** Construction du plasmide pXL2638.

Cette construction est effectuée comme cela est décrit dans l'exemple 1-2, par recombinaison homologue chez SF800 (*E. coli* *polA*). Amp<sup>r</sup> : gène de résistance à l'ampicilline; pMB1 Ori, origine de réplication de pMB1; Tet<sup>r</sup>, gène de résistance à la tétracycline; RK2 Ori, origine de réplication du plasmide RK2. Les parties circulaires

15 des cartes des plasmides, les séquences adénovirales ne sont pas à la même échelle.

### Techniques générales de clonage, de biologie moléculaire.

Les méthodes classiques de biologie moléculaires telles que la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium-bromure d'éthidium, les digestions par les enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, la transformation dans *E. coli*, la

20 précipitation des acides nucléiques etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis *et al.*, 1989).

Les enzymes ont été fournies par New-England Biolabs (Beverly, MA). Pour les ligatures les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille sur des gels d'agarose de 0,8 à 1,5 %, purifiés par GeneClean (BIO101, LaJolla CA) et incubés de

25 nuit à 14°C dans un tampon Tris-HCl pH 7.4 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en présence d'ADN ligase du phage T4.

Les ADN ligaturés sont utilisés pour transformer la souche rendue compétente *E. coli* TG1 [D(lac *proA*, *B*), *supE*, *thi*, *hsdD5*/ F *traD36*, *proA*<sup>+</sup>, *B*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*<sup>DM15</sup>] (Maniatis *et al.*, 1982) ou bien la souche *E. coli* *polA* SF800 (Heffron *et al.*, 1977).

30 L'amplification par PCR. (Polymerase Chain Reaction), a également été réalisée selon Maniatis *et al.*, 1989, avec les spécifications suivantes :

- Concentration en  $MgCl_2$  portée à 8 mM.

- Température de dénaturation 95°C, température d'hybridation 55°C, température d'allongement 72°C. Ce cycle a été répété 25 fois dans un PE9600 Thermalcycler (Perkin Elmer, Norwalk CO).

- 5 Les oligonucléotides sont synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites protégés en 3' par un groupement cyanoéthyl, (Sinha *et al.*, 1984, Giles 1985), avec le synthétiseur automatique d'ADN Applied Biosystem modèle 394, (Applied Biosystem, Foster City CA), selon les recommandations du fabricant.

- 10 Le séquençage a été effectué sur des matrices double-brin par la méthode de terminaison de chaînes en utilisant des amorces fluorescentes. Nous avons utilisé le kit de séquençage Taq Dye Primer Kit de chez Applied Biosystem (Applied Biosystem, Foster City CA) selon les spécifications du fabricant.

Exemple 1 : Clonage d'un génome adénoviral, adénovirus humain du type 5, bordé de sites de restriction uniques sur un plasmide du groupe d'incompatibilité P se répliquant

- 15 chez *E. coli*.

Exemple 1-1 : Cet exemple illustre comment les extrémités du génome adénoviral peuvent être amplifiées par PCR, de manière à border les extrémités, (ITR), par un site PacI.

- 20 Afin d'obtenir des fréquences de recombinaison satisfaisantes par la suite, nous avons choisi des fragments d'environ 400 bp qui ont été amplifiés.

Trois oligonucléotides ont été choisis :

- L'oligo 1 est commun aux deux amplifications puisqu'il correspond aux extrémités des ITR.

- 25 Les six premiers nucléotides constituent une queue qui évite la formation de structure secondaires. Les six nucléotides suivant constituent un site de restriction EcoRI qui est utilisé pour les étapes de clonage intermédiaires. Les huit nucléotides suivant créent un site PacI qui est absent du génome de l'Ad5 (la séquence de l'adénovirus Ad5 est accessible dans Genbank, mnémonique ADRCOMPGEN).

- 30 Les vingt-sept nucléotides suivant correspondent à l'extrémité gauche du génome de l'Ad5, position 1 à 27.

Séquence de l'oligo 1 : —

5' -CGGCGGGAATTCTTAATTAACATCATCAATAATATACCTTATTTTGG-3' SEQ ID N°1

-----  
EcoRI PacI



- L'oligo 3 utilisé avec l'oligo 1 permet d'amplifier un fragment de 384 bp à l'extrémité gauche. Il comprend une queue de six nucléotides. Les dix-huits nucléotides suivant créent les sites PstI, KpnI et SpeI. Les vingt-quatre nucléotides suivants correspondent à l'inverse-complémentaire de la séquence choisie sur l'Ad5 entre les positions 361 et

5 385.

Séquence de l'oligo 3 :

5' -CACCACCTGCAGGGTACCACTAGTGTCTCCACGTAAACGGTCAAAGTC-3' SEQ ID N°3

PstI KpnI SpeI

10 La matrice choisie pour l'amplification de l'extrémité gauche est le plasmide pCLAI. Le plasmide pCLAI contient l'extrémité gauche sous forme d'un fragment EcoRI-XbaI de 454 bp cloné dans pIC19H.

15 - L'oligo 2 utilisé avec l'oligo 1 permet d'amplifier un fragment de 418 bp à l'extrémité droite. Il comprend une queue de six nucléotides. Les six nucléotides suivant créent un site PstI. Les vingt-quatre nucléotides suivants correspondent à la séquence choisie sur l'Ad5 entre les positions 35517 et 35540.

Séquence de l'oligo 2 :

5' -CACCACCTGCAGGGCAGCCATAACAGTCAGCCTTACC-3' SEQ ID N°2

20

PstI

La matrice choisie pour l'amplification de l'extrémité droite est le plasmide pY23. Le plasmide pY23 contient l'extrémité droite sous forme d'un Fragment AvrII-BclI de 470 bp cloné aux sites compatibles XbaI-BamHI de pIC19H.

25 Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose. Les fragments de taille attendue ont été digérés par EcoRI et PstI, purifiés et ligaturés en présence de pUC19 digéré par EcoRI et PstI. Les deux plasmides recombinants obtenus ont été nommés pXL2623 pour l'extrémité gauche et pXL2624 pour l'extrémité droite. L'absence de mutation dans l'insert a été vérifiée par séquençage. Le fragment EcoRI-PstI de ces plasmides a été purifié comme précédemment décrit. Les deux fragments ont été mis

30 ensemble à ligaturer dans pUC19 linéarisé par EcoRI. Le plasmide recombinant obtenu est nommé pXL2626, il contient les extrémités de l'Ad5 en tête-bêche. (Fig 2).

Exemple 1-2 : Construction chez E.coli d'un plasmide contenant le génome adénoviral  $\Delta$ E1, $\Delta$ E3, bordé par des sites PacI.

Le vecteur retenu pour recevoir le génome adenoviral est pRK290, (Ditta et al., 1980), qui appartient au groupe d'incompatibilité P. Ce vecteur se réplique chez les souches d'*E. coli* *polA*.

La stratégie d'intégration retenue est la recombinaison homologue dans la souche

- 5 *E. coli* SF800 entre pXL2627 et le plasmide pFG144, (Graham et al., 1986).  
Le plasmide pFG144 contient la totalité du génome de l'Ad5 moins deux délétions dans les régions E1 et E3. Il dérive de pMX2 et possède le gène de résistance à l'Ampicilline ainsi qu'une origine de réplication pMB1 qui ne lui permet pas de se répliquer dans la souche *E. coli* SF800.

- 10 Dans un premier temps les extrémités tête-bêche du génome de l'Ad5 ont été clonées au site *EcoRI* unique de pRK290 selon le protocole déjà décrit pour la construction de pXL2626. Des cellules de la souche *E. coli* SF800 ont été rendues compétentes, transformées par pXL2627. Les cultures ont été étalées sur milieu LB en présence de tétracycline. A leur tour, les cellules issues d'un clone tétracycline résistant ont été
- 15 rendues compétentes, transformées par le plasmide pFG144, puis étalées sur milieu LB en présence de tétracycline et d'ampicilline. Etant donné que ce plasmide ne se réplique pas dans la souche *E. coli* SF800, l'acquisition des résistances à la tétracycline et ampicilline ne peut se produire que par un événement de recombinaison homologue entre les deux plasmides. En effet, ceux-ci ont en commun les extrémités droites, 418
- 20 bp, et gauches, 384 bp, du génome de l'Ad5. Les plasmides issus de ce premier événement de recombinaison possèdent deux jeux d'extrémités. (Fig 2). Un second crossing-over, interne au plasmide peut donc avoir lieu. Dans ce cas, parmi les deux événements possibles, un seul conduit à la construction désirée, l'autre entraîne la délétion complète du génome de l'Ad5 et la perte du gène de résistance à l'ampicilline.
- 25 Cette seconde recombinaison a été favorisée par une série de cultures dilution représentant 60 générations, en milieu LB supplémenté par de la tétracycline et de l'ampicilline. L'ADN de clones isolés a été soumis à une analyse par Southern Blot. La sonde oligonucléotidique suivante a été synthétisée :

5'-CGTGGAGACACTAGTGGTACCCTGCAGGGCAGCCATA-3' SEQ ID N°4

- 30 Les bases 1 à 9 correspondent à la région gauche de la position 377 à 385 sur la séquence de l'Ad5. Les bases 28 à 36 correspondent à la séquence de la région droite entre les positions 35517 à 35525. Des digestions par les endonucléases *PacI* et *ClaI*, ou encore *PacI* et *NdeI*, ont montré la structure plasmidique attendue. Un clone correspondant à un tel événement et ayant la structure plasmidique décrite Figure 3 à
- 35 été retenu. Celui-ci a été nommé pXL2628.

pXL2628 a été digéré par XbaI, religaturé, puis transformé dans des cellules E.coli TG1 compétentes. Un clone Tet<sup>R</sup> et Amp<sup>S</sup> a été retenu. Son profil de restriction montre que la région correspondant au pMX2 a été déléetée. Ce clone a été nommé pXL2638.

- 5 La digestion par PacI de pXL2638 libère le génome de l'Ad5 sous forme d'un fragment de 34 kb. Ce fragment peut être utilisé tel quel pour des expériences de transfection de cellules de mammifères transcomplémentantes pour les fonctions E1 de l'adénovirus.

Exemple 2 : Production d'adénovirus recombinants

- Des clones d'adénovirus recombinants peuvent être construits dans une première étape chez Escherichia coli, par insertions de fragments contenant un plusieurs gènes avec des signaux de régulation appropriés pour exprimer ces gènes dans les cellules de mammifères étudiées, ou délétion de certains fragments du génome de l'adénovirus, ou encore la combinaison de ces deux événements, puis ensuite, après transfection de cellules productrices, un stock d'un tel virus recombinant peut être obtenu.
- 10 Le plasmides pXL 2638 est purifié à partir d'une culture de cellules E. Coli TG1 compétentes transformées. Le génome adénoviral est libéré par digestion en présence de l'enzyme PacI. Le produit de digestion est utilisé directement pour produire les adénovirus recombinants. Pour cela, les cellules de la lignée 293 sont transfectées par le produit de digestion de pXL2638 en présence de phosphate de calcium. Les
- 15 adénovirus recombinants produits sont ensuite sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10<sup>10</sup> pfu/ml.

- Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus peut être conservé à - 80°C dans 20 % de glycérol.
- 25

**Références bibliographiques :**

- Ausubel et al., 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Wiley and Sons, New York.
- 5 Bolivar et al., 1977. Gene 2:95.
- Dagert et al., 1979. . Gene, 6, 23-28.
- 10 Ditta et al., 1980. Plasmid, 13, 149-154.
- Ghosh-Choudhury et al. 1986. Gene, 50, 161-171.
- Hamilton et al., 1989. J. Bacteriol. 171:4617-4622.
- 15 Hanahan, D. 1983. J. Mol. Biol. 166:557.
- Heffron et al., 1977. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 74, 702-706.
- 20 Maniatis T., et al. 1982.  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, New York.
- Miller, et al., 1988. J. Bacteriol. 170:2575-2583.
- Simoës, et al. 1991. New York Acad. Sci. 646:254-258.
- 25 Sinha N.D, et al. 1984. Nucl.Acids Res., 12, 4539-4557.
- Slater, et al. 1993. . J. Bacteriol. 175:4260-4262.
- 30 Viera. et al., 1982. Gene, 19, 259-268.
- Wirth, et al. 1989. Mol. Gen. Genet., 216, 175-177.
- Zeef, et al. 1994. EMBO J. 13:5113-5120.

LISTE DE SEQUENCES

5

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- 10 (A) NOM: RHONE POULENC RORER  
(B) RUE: 20 AVENUE RAYMOND ARON  
(C) VILLE: ANTONY CEDEX  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 92165  
15 (G) TELEPHONE: 40.91.69.22  
(H) TELECOPIE: 40.91.72.91

(ii) TITRE DE L'INVENTION: \_\_PROCEDE DE PREPARATION DE GENOME  
D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

20

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- 25 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 35 (A) LONGUEUR: 47 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

45 CGGCGGGAAT TCTTAATTA CATCATCAAT AATATACCTT ATTTTGG

47

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 50 (A) LONGUEUR: 37 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

5 CACCACCTGC AGGGCAGCCA TAACAGTCAG CCTTACC

37

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

10

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 48 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CACCACCTGC AGGGTACCAC TAGTGTCTCC ACGTAAACGG TCAAAGTC

48

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 37 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

40

CGTGGAGACA CTAGTGGTAC CCTGCAGGGC AGCCATA

37

### REVENDICATIONS

1. Plasmide procaryote comprenant un génome d'adénovirus recombinant bordé par un ou plusieurs sites de restriction non présent dans ledit génome.
- 5 2. Plasmide procaryote caractérisé en ce qu'il comprend une première région permettant la réplication dans les cellules procaryotes et une deuxième région comportant un génome adénoviral bordé d'un ou plusieurs sites de restriction non présent dans ledit génome.
- 10 3. Plasmide selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que la région permettant la réplication comprend une origine de réplication fonctionnelle dans les cellules procaryotes.
4. Plasmide selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'origine de réplication est issue d'un plasmide bactérien choisi parmi RK2, pBR322 et pUC.
- 15 5. Plasmide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la première région permettant la réplication comprend également une région permettant la sélection des cellules procaryotes contenant ledit plasmide.
6. Plasmide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le génome adénoviral recombinant comprend au moins des séquences ITR et une séquence d'encapsidation.
- 20 7. Plasmide selon la revendication 6 caractérisé en ce que le génome adénoviral est dépourvu de tout ou partie de la région E1.
8. Plasmide selon la revendication 7 caractérisé en ce que le génome adénoviral est dépourvu d'une partie de la région E1 correspondant aux résidus 454 à 3328 ou 382 à 3446.
- 25 9. Plasmide selon la revendication 6 ou 7 caractérisé en ce que le génome adénoviral est dépourvu de tout ou partie de la région E4 et/ou E3 et/ou Iva2.
10. Plasmide selon la revendication 9 caractérisé en ce que le génome adénoviral est dépourvu d'une partie de la région E4 comprenant au moins les phases ORF3 et/ou ORF6.

11. Plasmide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le génome adénoviral est d'origine humaine ou animale.
12. Plasmide selon la revendication 11 caractérisé en ce que le génome adénoviral est un génome adénoviral humain de type 2 ou 5.
- 5 13. Plasmide selon la revendication 11 caractérisé en ce que le génome adénoviral est un génome adénoviral canin choisi parmi le sérotype CAV2.
14. Plasmide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le génome adénoviral recombinant dérive d'un adénovirus Ad5 et est bordé de sites PacI, NspV ou SwaI.
- 10 15. Plasmide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le génome adénoviral recombinant comprend un acide nucléique d'intérêt.
16. Plasmide pXL2638 caractérisé en ce qu'il comprend l'origine de réplication du plasmide RK2, le gène de résistance à la tétracycline, et un génome d'adénovirus recombinant possédant des régions E1 et E3 non fonctionnelles et bordé de 2 sites
- 15 PacI.
17. Cellule procaryote contenant un plasmide selon l'une des revendications 1 à 16.
18. Procédé de production de génomes adénoviraux recombinants comprenant la culture de cellules procaryotes selon la revendication 17, et la récupération des plasmides.
- 20 19. Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que, dans une étape supplémentaire, les plasmides sont traités de manière à exciser le génome adénoviral.
20. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que les plasmides sont traités en présence de l'enzyme de restriction correspondant aux sites bordant le génome adénoviral.
- 25 21. Procédé de préparation d'adénovirus recombinants caractérisé en ce que l'on transfecte une lignée cellulaire d'encapsidation avec un génome adénoviral préparé selon le procédé de la revendication 18, 19 ou 20 et on récupère les adénovirus produits.



22. Procédé selon la revendication 21 caractérisé en ce que la lignée cellulaire est la lignée 293.

23. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants préparés selon le procédé de la revendication 18.

1/18

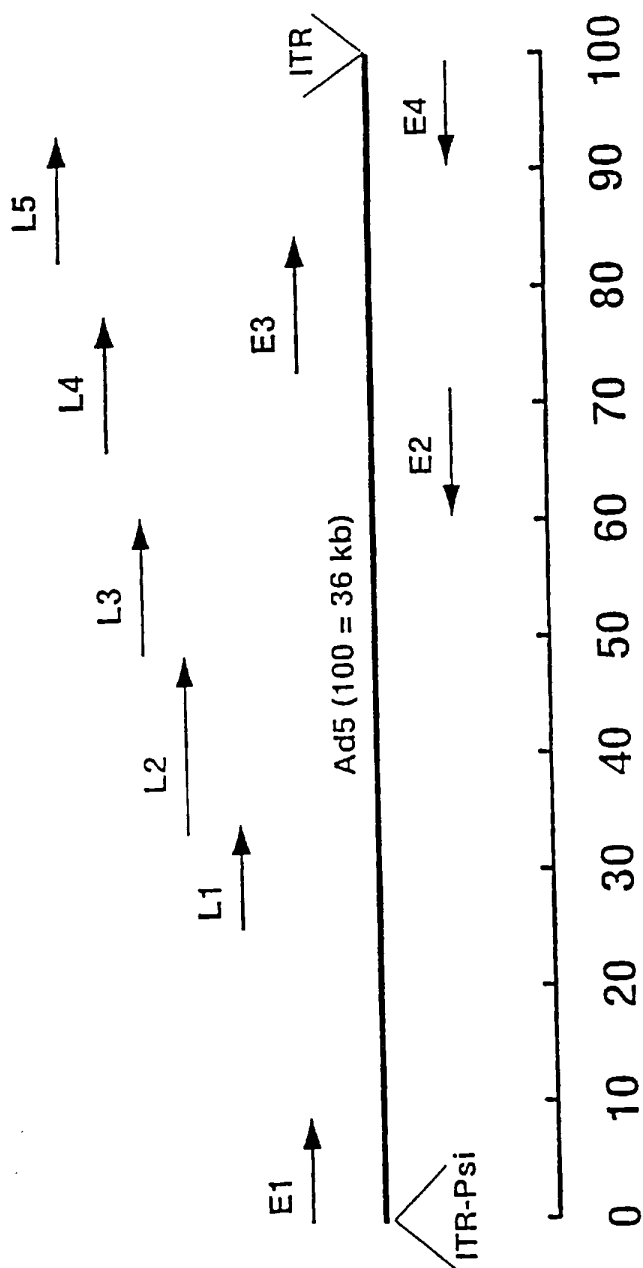
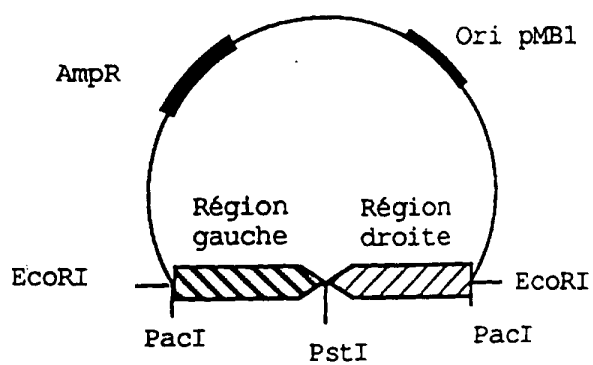
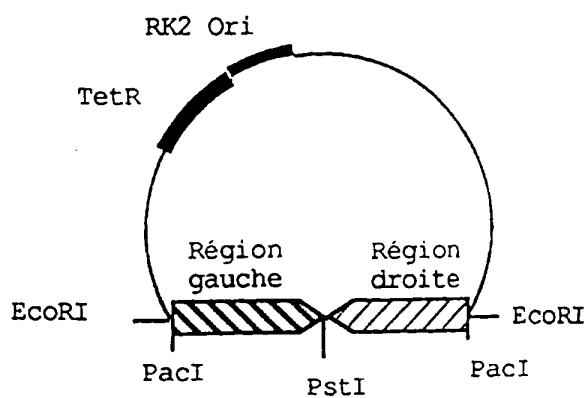


Figure 1

2/18



pXL 2626  
3,5 kb



pXL 2627  
21 kb

0,8 kb

Figure 2

3/18

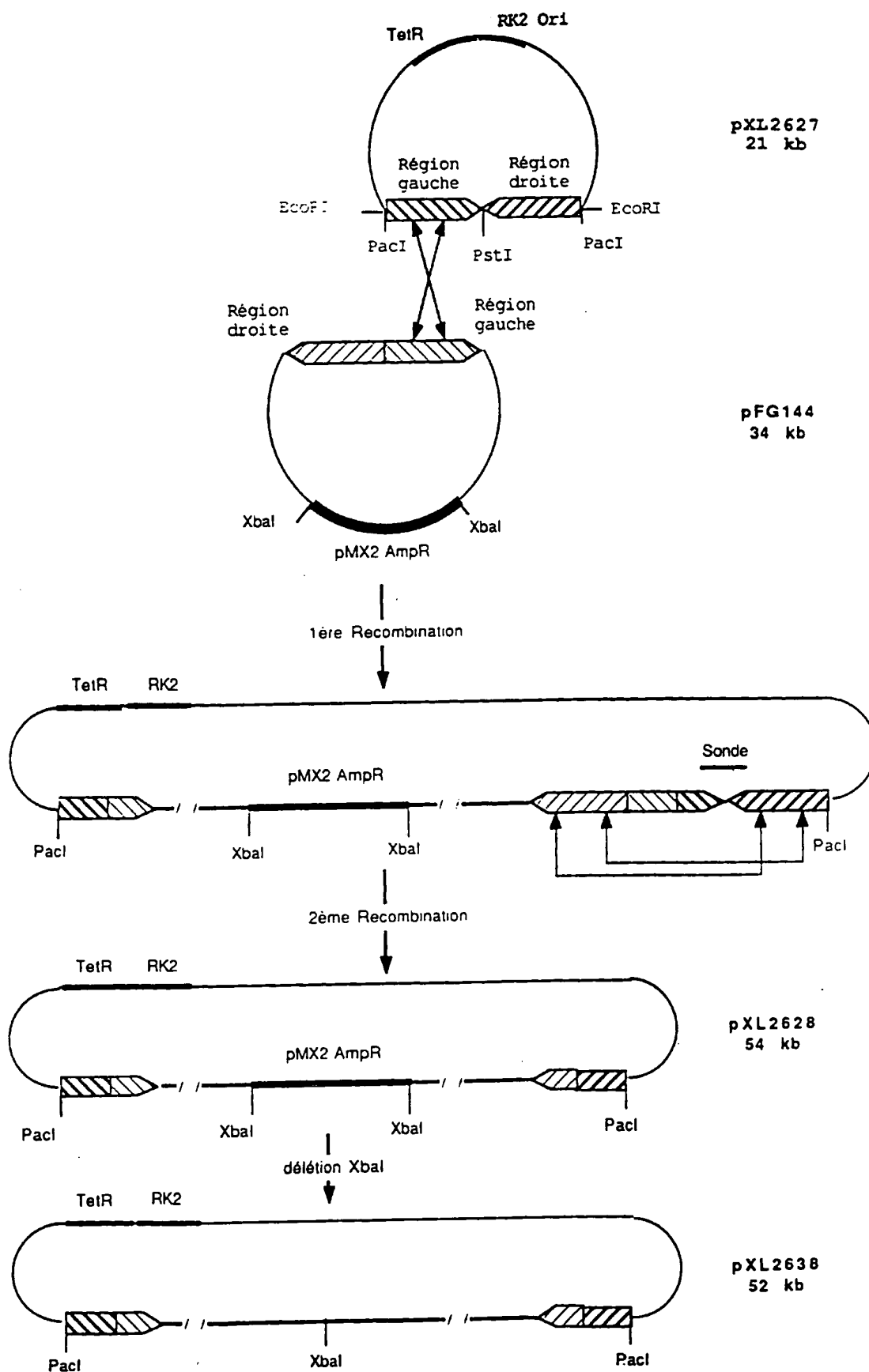


FIGURE 3

4/18

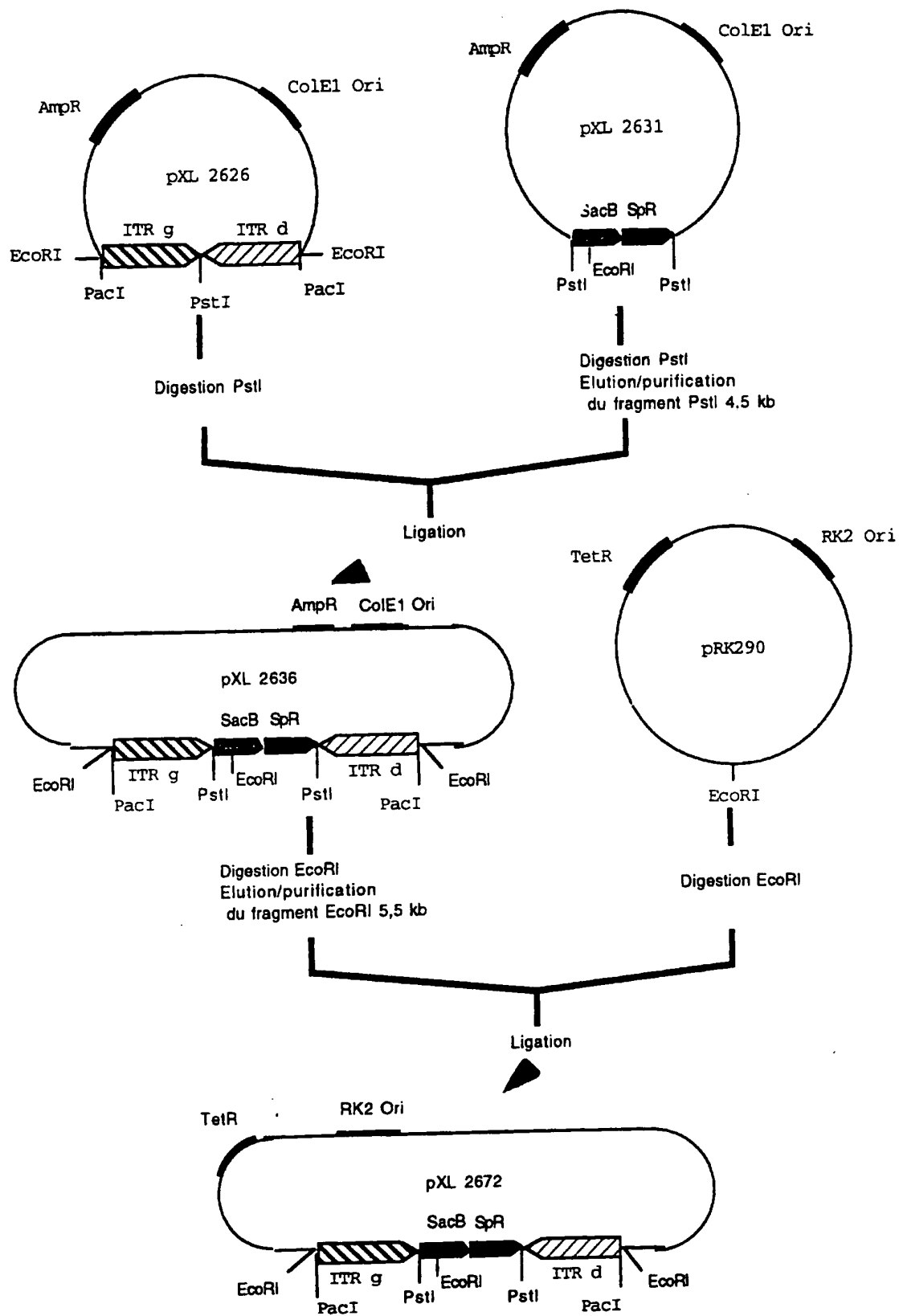


Figure 4

# CONSTRUCTION DE pXL2689 FORME REPLICATIVE CHEZ *E. coli* DE L'Ad5 $\Delta$ E1,E3

pXL2672

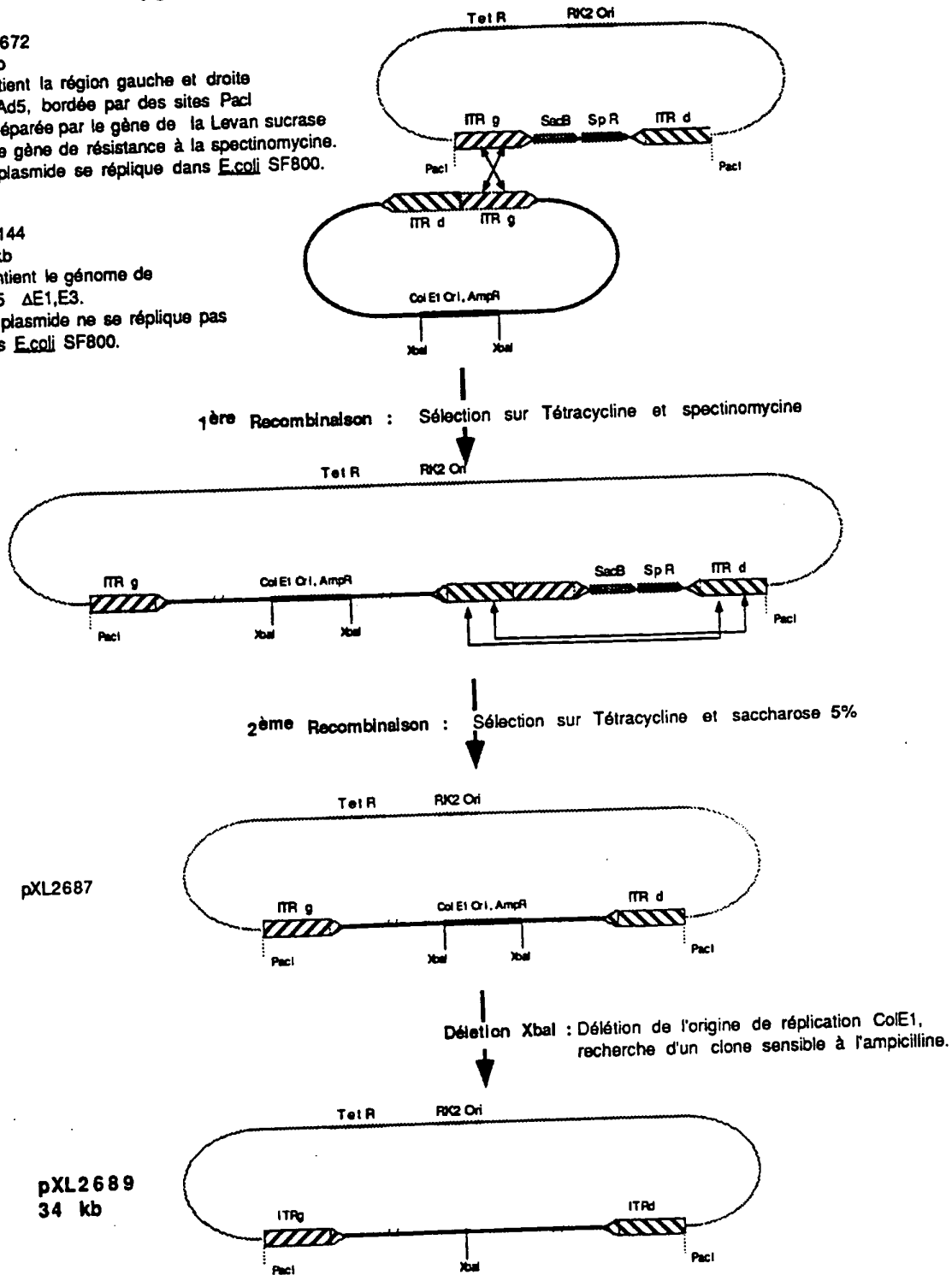
21 kb

-Contient la région gauche et droite de l'Ad5, bordée par des sites *PacI* et séparée par le gène de la Levansucrase et le gène de résistance à la spectinomycine.  
-Ce plasmide se réplique dans *E. coli* SF800.

pFG144

33 kb

-Contient le génome de l'Ad5  $\Delta$ E1,E3.  
-Ce plasmide ne se réplique pas dans *E. coli* SF800.



pXL2689, contient la totalité du génome de l'Ad5  $\Delta$ E1,E3.  
La digestion *PacI* libère un fragment de 34 kb directement utilisable pour la transfection de cellules de mammifère.

Figure 5

6/18

## CONSTRUCTION DE pXL2647 et pXL2675

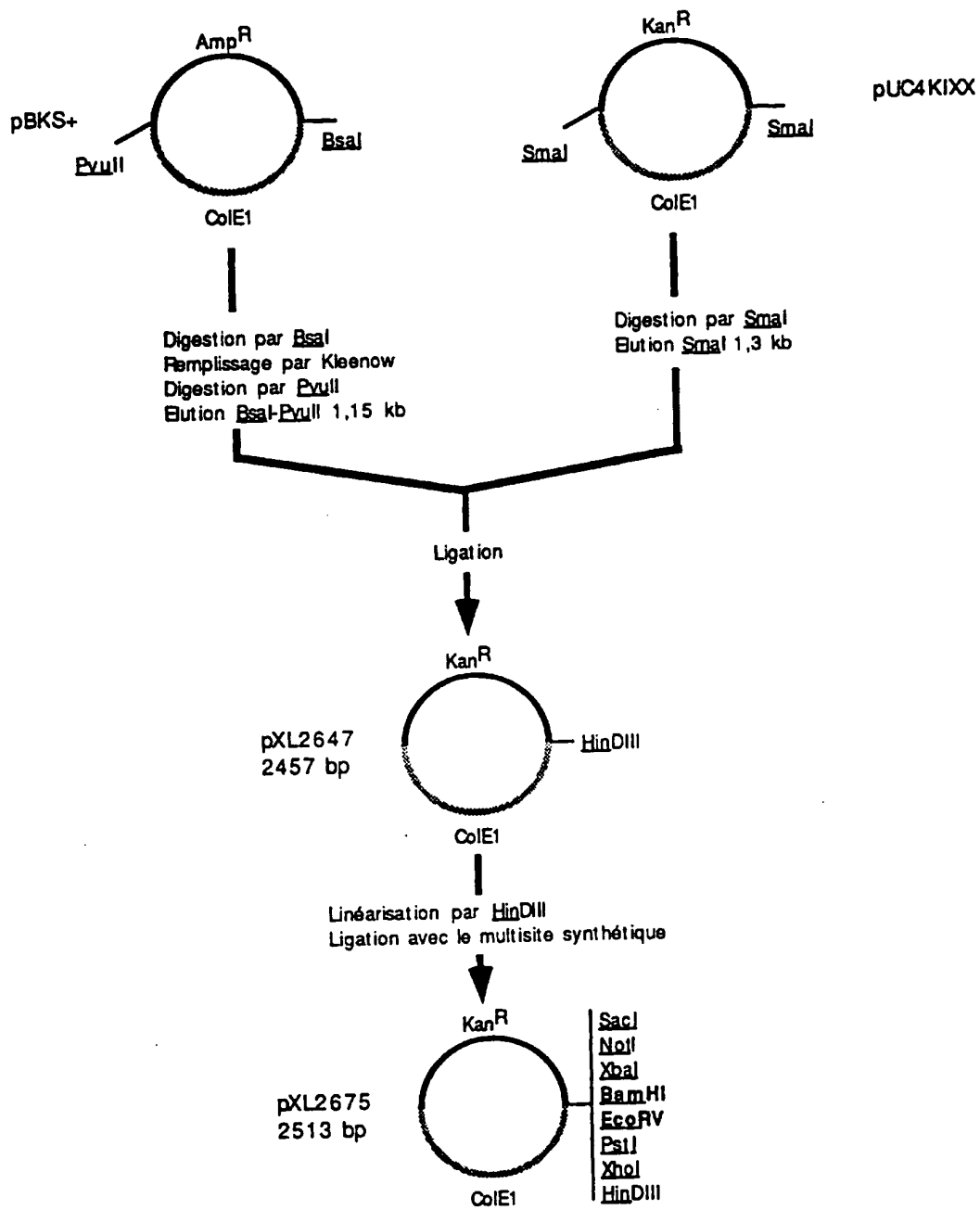


Figure 5a

7/18

## CONSTRUCTION DE PXL2756

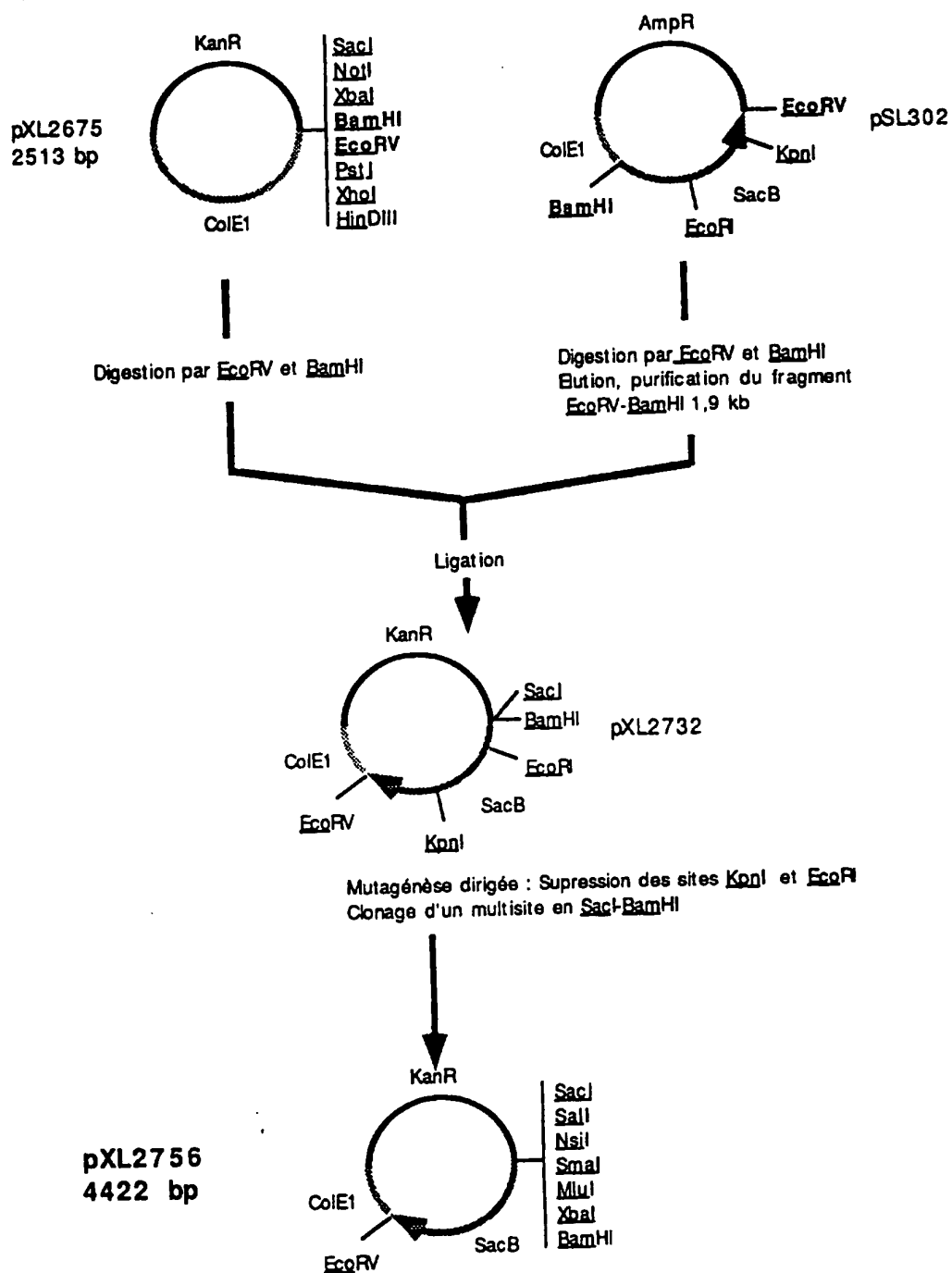


Figure 6



8/18

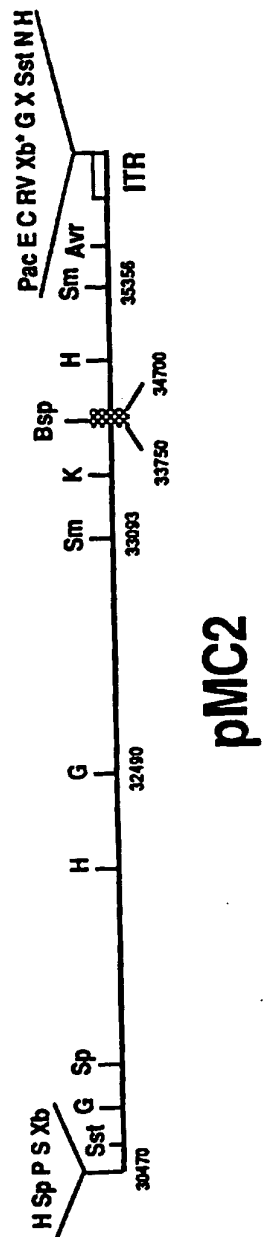
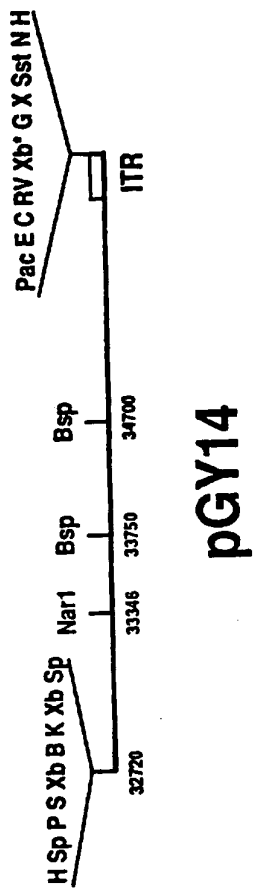
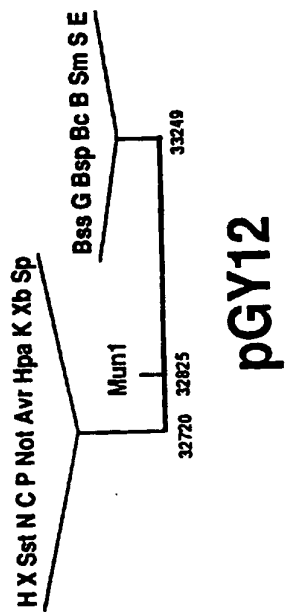
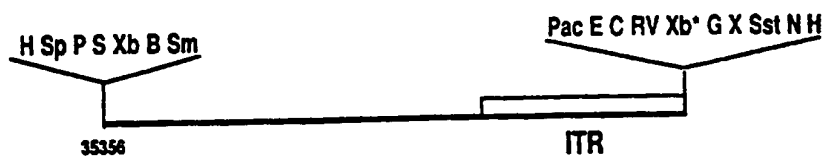
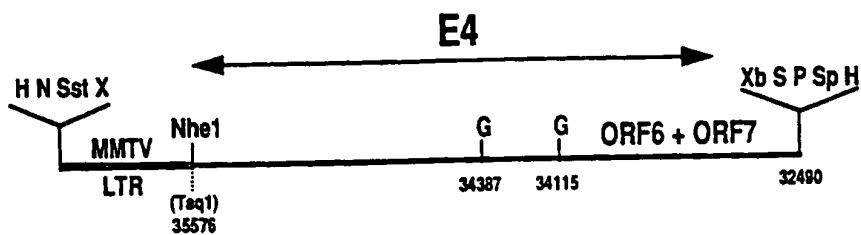


Figure 7

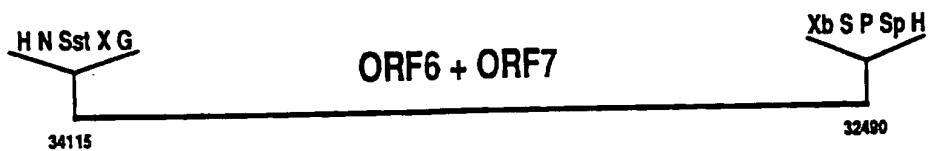
9/18



**pPY61**



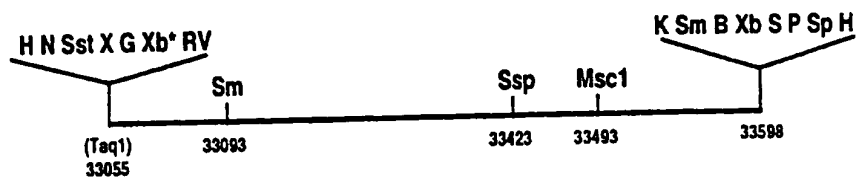
**pPY6**



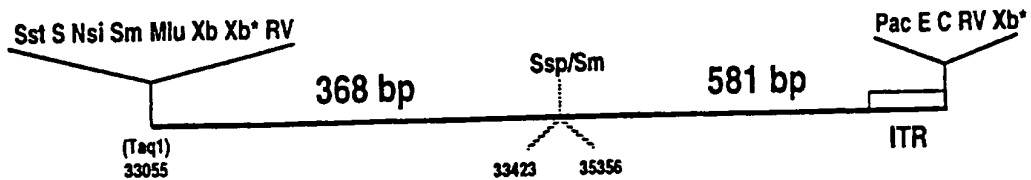
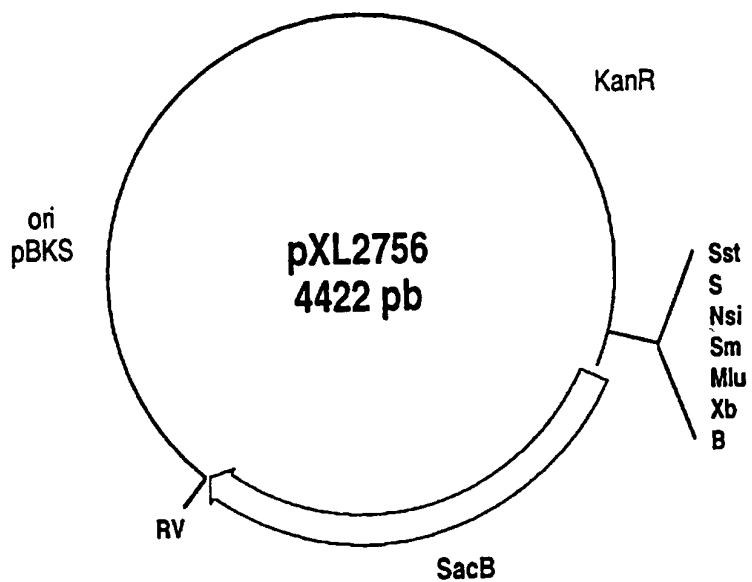
**pPY13**

Figure 8

10/18



**pYJ3**



**pYJ6**

Figure 9

11/18

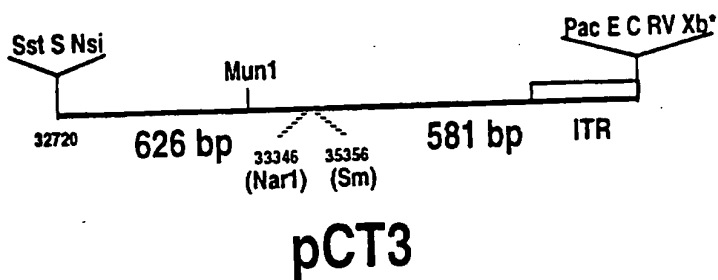
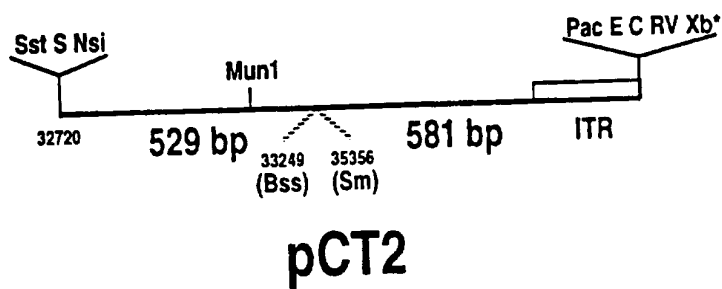
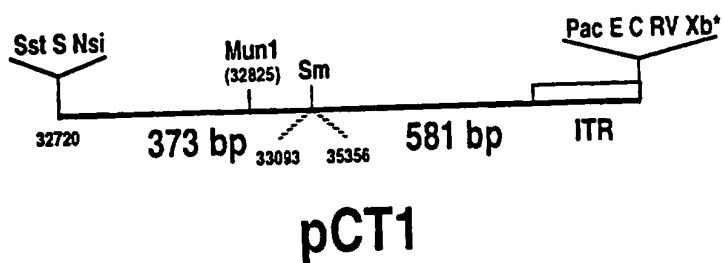
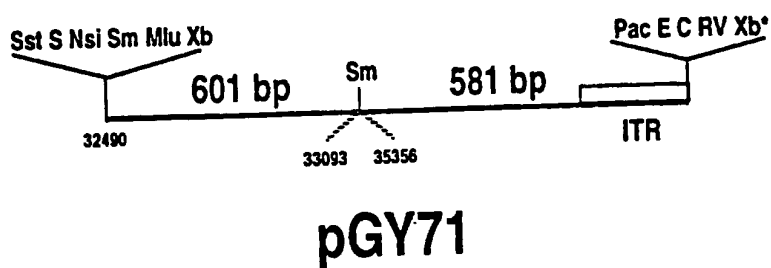


Figure 10

12/18

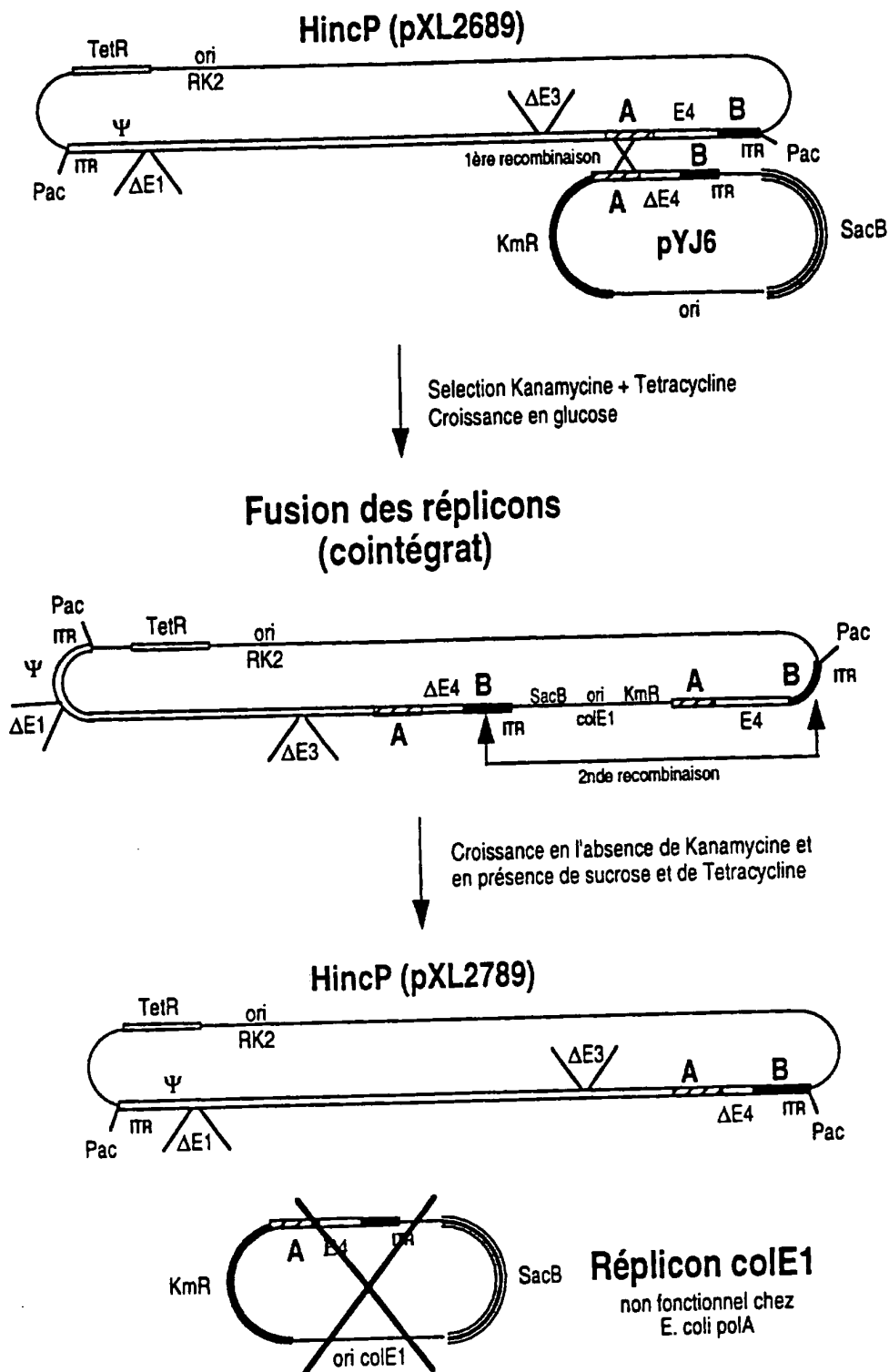
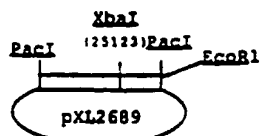


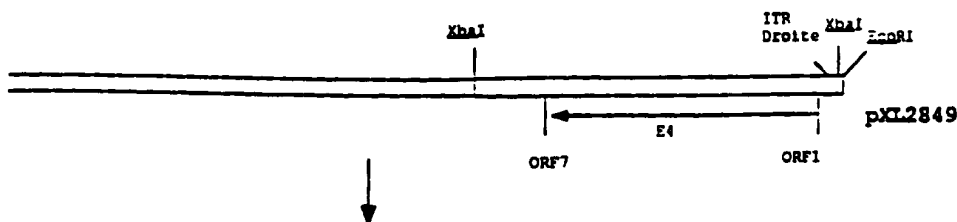
Figure 11

13/18

Délétions aléatoires de la région E4 générées par ExoIIIPlasmide de départ : pXL2689; région E4 region de la position 27574 à 30190Site unique *Xba*I à la position 25123

↓ Digestion par *Xba*I/*Eco*RI, ligature dans pXL2675 (kana)

Création d'un deuxième site *Xba*I puis introduction dans le génome par double recombinaison homologue



↓ Clonage du fragment *Xba*I/*Eco*RI dans un vecteur d'origine ColE1, linearisation du plasmide par les enzymes choisies, puis digestion par ExoIII, et ligature.

↓ Estimation de la taille des délétions générées par PCR

↓ Digestion par *Xba*I des plasmides portant les délétions, purification des fragments, et substitution par clonage de la région E4 sauvage par la région E4 délétée

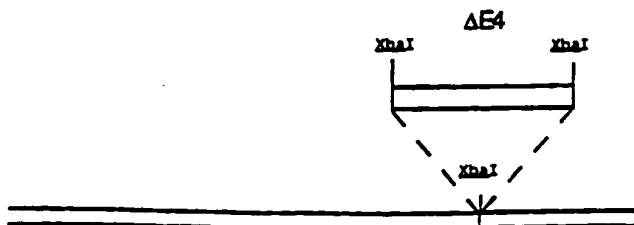
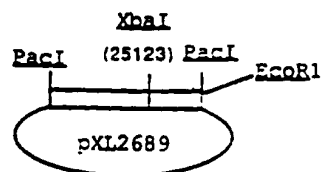


Figure 12a

14/18

Délétions aléatoires de la région E4 générées par Bal31

Plasmide de départ : pXL2689; région E4 region de la position 27574 à 30190  
 Site unique XbaI à la position 25123

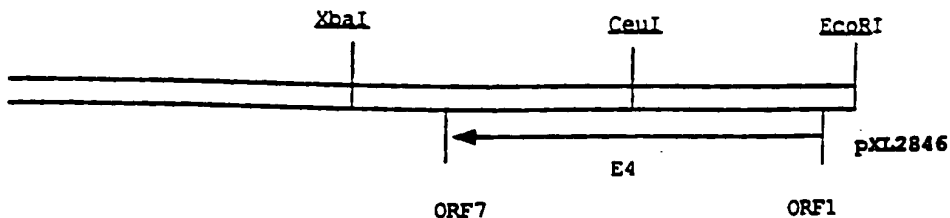


↓  
 Digestion par XbaI/EcoRI. Ligature dans pXL2675 pour génère pXL2845

Création d'un site unique CeuI, par exemple, dans la région E4 sur le fragment XbaI/EcoRI du pXL2845



Double recombinaison homologue pour créer le site CeuI à une position prédéterminé dans la région E4 region du pXL2689



Digestion par CeuI pour linéariser le pXL2846, digestion par Bal31 pour générer des délétions, ligature des plasmides délétés.

Figure 12b

15/18

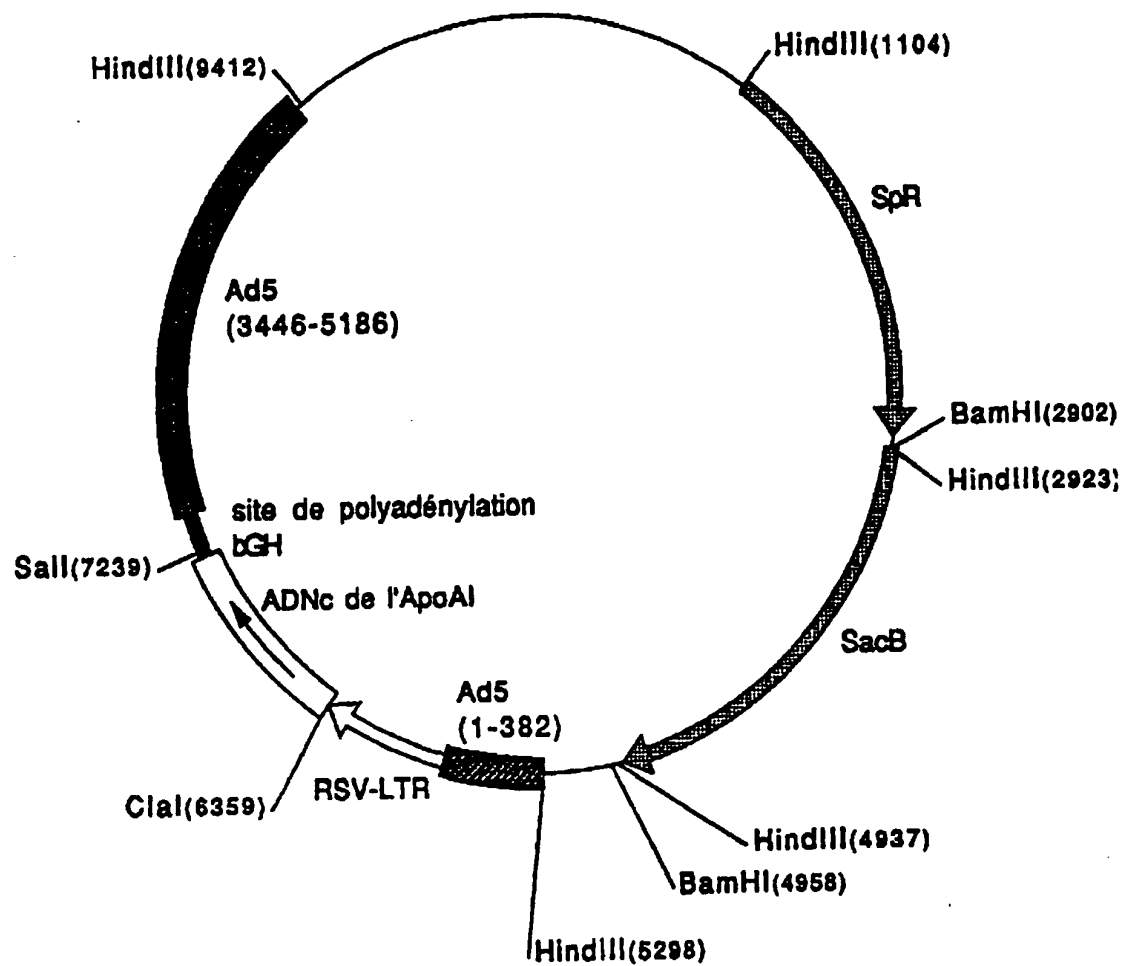


Figure 13



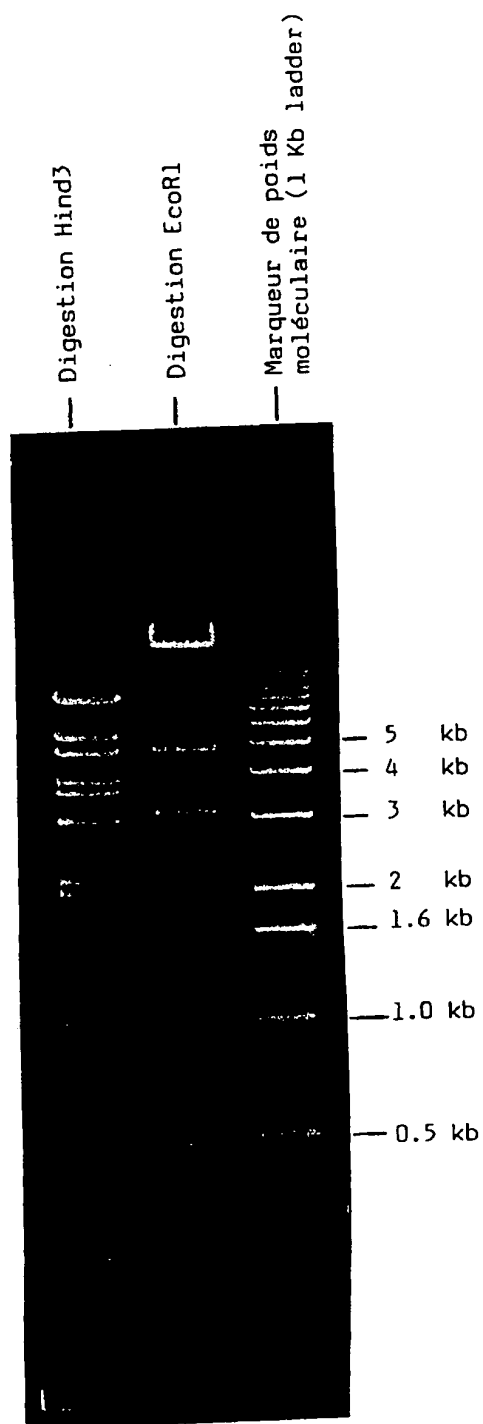


Figure 14

17/18

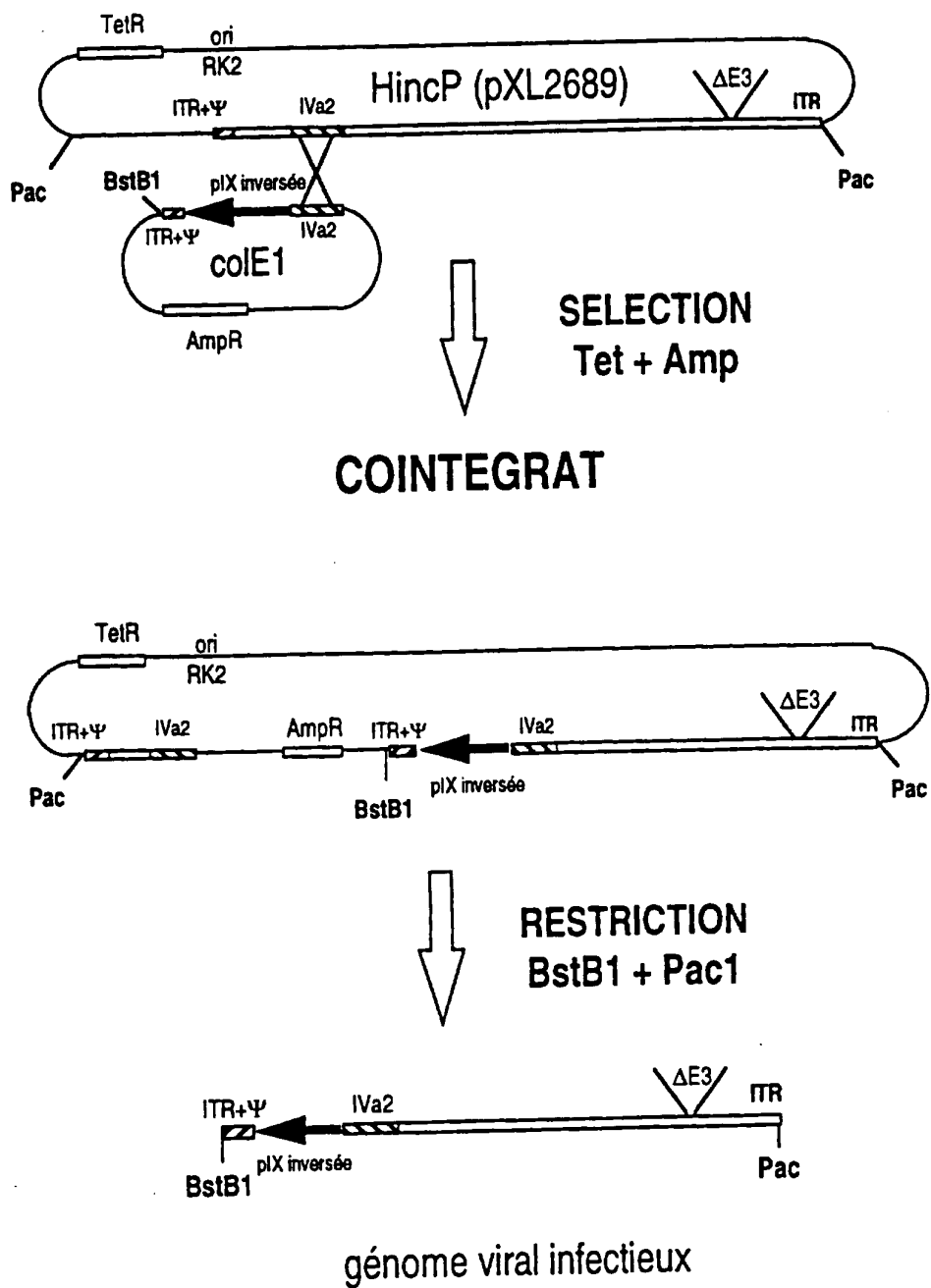
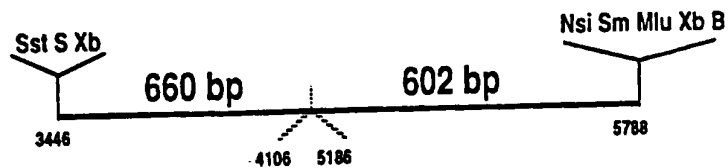
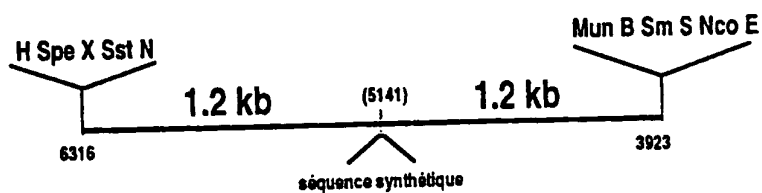


Figure 15

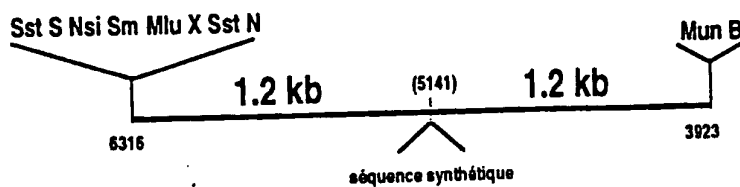
18/18



**pGY57**



**pGY39**



**pGY52**

Figure 16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC/FR 96/00215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/86 C12N15/34 C12N15/70 C12N7/01 C12N1/21  
A61K35/76 //(C12N1/21,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GENE, vol. 50, no. 1-3, 1986, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL; pages 161-171, XP002004335 G. GHOSH-CHOUDHURY ET AL.: "Human adenovirus cloning vectors based on bacterial plasmids" cited in the application en entier	1-9, 11, 12, 17-22
X	WO, A, 95 00655 (MC MASTER UNIVERSITY) 5 January 1995  en entier	1-9, 11, 12, 15, 17, 18, 21, 22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May 1996

Date of mailing of the international search report

27.06.96

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PC1/FR 96/00215

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUMAN GENE THERAPY, vol. 4, 1993, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 461-476, XP002004336 D.P. RICH ET AL.: "Development and analysis of recombinant adenoviruses for gene therapy of cystic fibrosis" cited in the application en entier	1-9,11, 12,15, 17,18, 21,22
X	--- PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 91, no. 13, 13 September 1994, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 8802-8806, XP002004337 A.J. BETT ET AL.: "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3" en entier	1-9,11, 12,15, 17,18, 21,22
X	--- EMBO J., vol. 3, no. 12, 1984, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB;, pages 2917-2922, XP002004338 F.L. GRAHAM : "covalently closed circles of human Adenovirus DNA are infectious" cited in the application en entier	1-9,11, 12,17-22
Y	--- WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 January 1995 see page 21, line 20 - line 26; claims 28-30; figures 4,5	1-22
Y	--- WO,A,95 03400 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 2 February 1995 see page 7, line 2 - page 12, line 8 see page 18, line 9 - line 26 see claims 1-7,11-15,19-25,29-36 see figures 7A, 7B	1-22
A	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 8, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 3037-3048, XP002004339 G. KETNER ET AL.: "Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids" en entier	1-23
2	--- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/FR 96/00215

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PROC. NATL.ACAD SCI.,  vol. 81, October 1984, NATL. ACAD  SCI.,WASHINGTON,DC,US;.  pages 6290-6294, XP002004340  V. NATARAJAN ET AL.: "Proximal and distal  domains that control in vitro  transcription of the adenoviral IVa2 gene"  see the whole document  -----</p>	1-23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 96/00215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9500655	05-01-95	AU-B- CA-A- EP-A-	7118494 2166118 0705344 17-01-95 05-01-95 10-04-96
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- FR-A- AU-B- CA-A- CN-A- CZ-A- EP-A- FI-A- JP-T- NO-A- NZ-A- PL-A- ZA-A-	2707664 2718749 7264694 2144040 1113390 9500639 0667912 951138 8501703 950939 269156 308122 9405012 20-01-95 20-10-95 13-02-95 26-01-95 13-12-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 27-02-96 10-03-95 26-03-96 24-07-95 20-02-95
WO-A-9503400	02-02-95	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des. 'c Internationale No  
PC1/FR 96/00215

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/86 C12N15/34 C12N15/70 C12N7/01 C12N1/21  
A61K35/76 //(C12N1/21,C12R1:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GENE, vol. 50, no. 1-3, 1986, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL; pages 161-171, XP002004335 G. GHOSH-CHOUDHURY ET AL.: "Human adenovirus cloning vectors based on bacterial plasmids" cité dans la demande en entier	1-9, 11, 12, 17-22
X	WO, A, 95 00655 (MC MASTER UNIVERSITY) 5 Janvier 1995  en entier	1-9, 11, 12, 15, 17, 18, 21, 22

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*A\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 Mai 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27.06.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCI/FR 96/00215

C.(note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
X	HUMAN GENE THERAPY, vol. 4, 1993, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 461-476, XP002004336 D.P. RICH ET AL.: "Development and analysis of recombinant adenoviruses for gene therapy of cystic fibrosis" cité dans la demande en entier	1-9,11, 12,15, 17,18, 21,22
X	--- PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 91, no. 13, 13 Septembre 1994, NATL. ACAD SCI.,WASHINGTON,DC,US;, pages 8802-8806, XP002004337 A.J. BETT ET AL.: "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3" en entier	1-9,11, 12,15, 17,18, 21,22
X	--- EMBO J., vol. 3, no. 12, 1984, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;, pages 2917-2922, XP002004338 F.L. GRAHAM : "covalently closed circles of human Adenovirus DNA are infectious" cité dans la demande en entier	1-9,11, 12,17-22
Y	--- WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 Janvier 1995 voir page 21, ligne 20 - ligne 26; revendications 28-30; figures 4,5	1-22
Y	--- WO,A,95 03400 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 2 Février 1995 voir page 7, ligne 2 - page 12, ligne 8 voir page 18, ligne 9 - ligne 26 voir revendications 1-7,11-15,19-25,29-36 voir figures 7A, 7B	1-22
A	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 8, IRL PRESS LIMITED,OXFORD,ENGLAND, pages 3037-3048, XP002004339 G. KETNER ET AL.: "Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids" en entier	1-23
2	--- -/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den 'e Internationale No  
PCT/FR 96/00215

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 81, Octobre 1984, NATL. ACAD SCI.,WASHINGTON,DC,US;, pages 6290-6294, XP002004340 V. NATARAJAN ET AL.: "Proximal and distal domains that control in vitro transcription of the adenoviral IVa2 gene" voir le document en entier -----</p>	1-23

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au nombre de familles de brevets

Dem. Internationale No  
PCT/FR 96/00215

Renseignements relatifs au		Membres de familles de brevets	
Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9500655	05-01-95	AU-B- 7118494	17-01-95
		CA-A- 2166118	05-01-95
		EP-A- 0705344	10-04-96
-----			
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664	20-01-95
		FR-A- 2718749	20-10-95
		AU-B- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		ZA-A- 9405012	20-02-95
-----			
WO-A-9503400	02-02-95	AUCUN	
-----			